

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

ÚJ LEHETŐSÉG A VÉR-AGY GÁT MEGNYITÁSÁRA: A TEZMILIFEN ÉS A RÖVIDLÁNCÚ ALKILGLICEROLOK HATÁSA AGYI ENDOTÉLSEJTEKEN

Doktori értekezés tézisei

Walter Fruzina

Témavezetők

Dr. Deli Mária, tudományos tanácsadó

Dr. Veszélka Szilvia, tudományos munkatárs

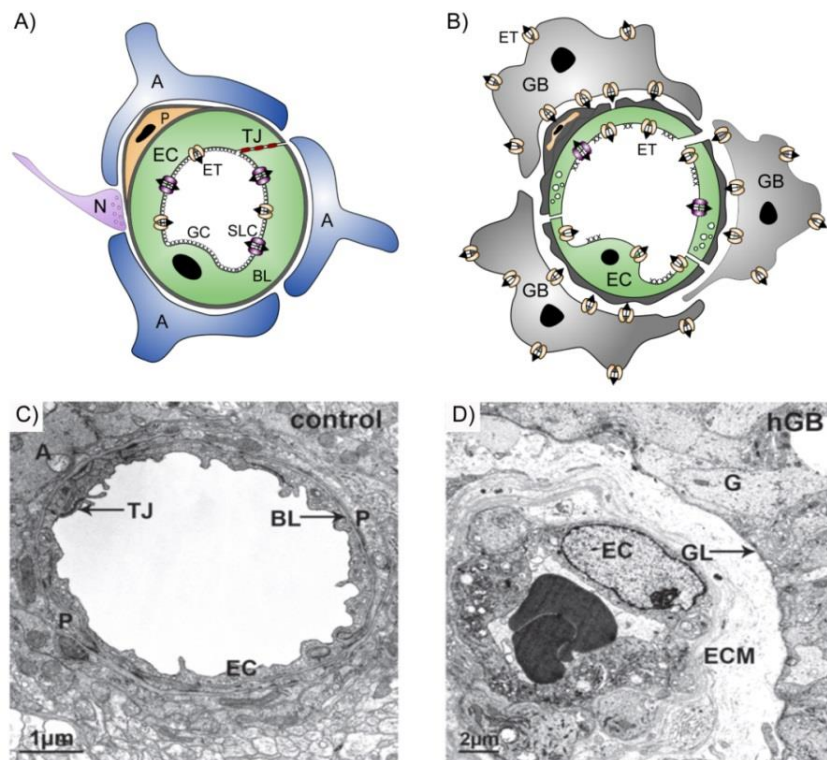
Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet
Biológiai Barrierék Kutatócsoport



Szeged
2015

1. Bevezetés és célkitűzések

A vér-agy gát a központi idegrendszer és a vér között dinamikus határfelületet képező sejtek funkcionális egysége. Az agyi endotélsejtek közti szoros kapcsolatok és a sejteken kifejeződő számos efflux pumpa elsődleges szerepe az idegrendszer védelme, többek között a káros vegyületek agyszövetbe jutásának megakadályozása. Ugyanakkor ez a két mechanizmus gátolja a gyógyszerek és gyógyszerjelöltek agyba való bekerülését is, és ezzel megnehezíti a központi idegrendszeri betegségek, például az agytumorkok kezelését. A glióma a felnőtt korosztályban leggyakrabban előforduló agytumor, amelynek legsúlyosabb fajtája az asztrocitából vagy annak prekursoraiból kialakuló gyógyíthatatlan glioblasztóma multiforme. A gliómák kezelése jelenleg sugárterápiával kombinált kemoterápiával és/vagy műtéttel lehetséges, amivel csak rövid távú túlélést lehet biztosítani. A terápiás hatástalanság fő oka a vér-agy gát tulajdonságai és transzportfolyamatai miatt az alacsony gyógyszerbejutás, ezért a gliómák mikroereinek tanulmányozása régóta a kutatás előterében áll. Az elmúlt évtizedekben kiterjedt kutatások folytak a betegség megállítására és gyógyítására, és napjainkban is fennáll az igény új, lehetséges terápiás szerek és adjuvánsok felkutatására.



1. ábra. Funkcionális és morfológiai eltérések a vér-agy gáton gliómában. **A és C:** vér-agy gát morfológia ép sejtközötti szoros kapcsolattal (TJ), transzporterekkel; fiziológias kapcsolat a neuro-vaszkuláris egység tagjai között. **B és D:** A vér-agy gát gliómában. Elektronmikroszkópos képek: Wolburg és mtsai, 2012. A: asztroglia; BL: bazális lamina; EC: endotélsejt; ECM: extracelluláris mátrix; ET: efflux transzport; GC: glikokalix; hGB: humán glioblasztóma; N: idegsejt; TJ: szoros kapcsolat; SLC: tápanyag szállító fehérje.

A vér-agy gáton történő legfőbb változások gliómában az alábbiak: (i) megnő az endotélsejtek száma, (ii) funkció nélküli eldotélsejtek alakulnak ki (hiperplázia), (iii) az endotélsejtek sejttérfogata lecsökken, (iv) a sejtek alakja megváltozik, (v) az endotélsejtek közötti szoros zárókapcsolatok felbomlanak, (vi) endoteliális vezikulák, fenesztrációk jelennek meg, (vii) a bazális membrán megvastagodik, szabálytalanná válik, (viii) a perivaszkuláris tér kitágul, (ix) sejtnekrózis lép fel a mikroér sejtekben, (x) a glióma sejtek kiszorítják az egészséges glia végtalpakat (1. ábra). Mindezek a morfológiai változások befolyásolják a vér-agy gát működését.

Több lehetőség áll rendelkezésre a gyógyszerek vér-agy gáton való átjuttatására, köztük az agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok megnyitása vagy az efflux pumpák gátlása (1. táblázat). Kísérleteinkben a rövidláncú alkilglicerolokat és a tezmilifent vizsgáltuk, mint két új potenciális, a vér-agy gátat megnyitó vegyületet.

1. táblázat. A vér-agy gát működésének módosítása a sejtek közötti kapcsolatokat célzó megnyitással gyógyszerbejuttatás elősegítésére. (Deli 2011, módosítva)

Módszer	Gyógyszermolekula, bejutott anyag	Gyógyszerfejlesztési fázis	Ref.
Ozmotikus vér-agy gát megnyitás mannitollal	Kemoterapeutikumok (intraarteriális alkalmazás agytumорок kezelésére)	Klinikai alkalmazás	Doolittle, 2014
Rövidláncú alkilglicerolok és oligoglicerolipidek	Fluoreszcein, albumin, kemoterapeutikumok, antibiotikumok, antitestek	Preklinikai fázis, állatkísérletek	Erdlenbruch 2003a,b Genzyme 2010
Cereport (bradikinin analóg)	Kemoterapeutikumok: carboplatin	Fázis I-II. vizsgálat után leállítva	Packer 2005
Zonula occludens toxin	Kemoterapeutikumok: metotrexát, paclitaxel (intrakarotid alkalmazás)	Állatkísérletek	Menon 2005
Nitrogén monoxid donor	Szukróz, γ -amino vajsav (intrakarotid alkalmazás és in situ agyi perfúzió)	Állatkísérletek	Weyerbrock 2012
Magas frekvenciájú ultrahang (célzott)	Antitestek, doxorubicin	Állatkísérletek	Burgess 2014
Tezmilifen	Kis molekulájú anyagok, paracelluláris átjutás	preklinikai fázis, állatkísérletek	Deli 2000, 2003 Walter 2015

Állatkísérletekben a rövidláncú alkilglicerolok, az 1-*O*-pentilglicerol (PG) vagy a 2-*O*-hexildiglicerol (HG) közvetlenül artériába adva koncentrációfüggő módon, visszafordíthatóan nyitják meg a vér-agy gátat és növelik hatóanyagok bejutását az agyszövetbe. Azonban kísérleteink kezdetén az alkilglicerolok közvetlen hatása agyi endotélsejtekre, illetve lehetséges hatásmechanizmusa nem volt ismert. A tezmilifen, egy tamoxifen származék, ami fokozza a kemoterápiás szerek daganatellenes hatását, ugyanakkor védi az ép szöveteket mind kísérletes, mind klinikai vizsgálatokban. Betegek tezmilifen kezelése során átmeneti központi idegrendszeri mellékhatásokat figyeltek meg, amelyek a vér-agy gát megnyílására utaltak. A csoportunk korábbi kísérleteiben a tezmilifen fokozta a vér-agy gát áteresztőképességét patkányokban és agyi endotélsejt tenyészeteken is. Célunk ezért az volt, hogy megvizsgáljuk az alkilglicerolok és a tezmilifen közvetlen hatását tenyésztett agyi endotélsejteken, és hogy tanulmányozzuk, hogy a tezmilifen hogyan befolyásolja a vér-glióma gát áteresztőképességét patkányokban.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Kísérleti állatok

Az állatokon végzett vizsgálatok a magyarországi (1998. XXVIII.) és az Európai Unió által (2010/63/EU) alkotott az állati jólétről szóló és az állatvédelem alapelveit meghatározó törvényeknek és előírásoknak megfelelően történtek. Kísérleteinkhez Wistar patkányokat használtunk (hímek és nőstények vegyesen, Harlan Laboratories, Egyesült Királyság), amelyek a Szegedi Biológiai Kutatóközpont konvencionális állatházából származtak.

2.2. Vegyszerek

Minden reagenst a Sigma Aldrich Magyarország Kft.-től rendeltük, hacsak másképp nem jelöltük. A tezmilifent (HCl só, Mw: 319,9 g/mol) por formájában Dr. Lorne J. Brandestől, a kanadai Winnipegi Egyetem professzorától kaptuk. A rövidláncú alkilglicerolokat a Genzyme (Cambridge, MA, USA) cégtől szereztük be, amelytől engedélyt kaptunk ezen anyagok használatára.

2.3. Glióma beültetés és az agyba való festékbejutás vizsgálata tezmilifen kezelés után

A tezmilifen hatását a vér-agy gát és a vér-glióma gát jelzőanyagokra való átjárhatóságára 3 hónapos álműtött (n=12) és glióma beültetett (n=12) Wistar patkányokon vizsgáltuk. Az RG2 patkány glioblasztóma sejtek agyba való beültetése egy korábban leírt és hatékony kísérleti protokoll alapján történt (Aas és mtsai, 1995). Két héttel a beültetést

követően a vér-agy gát és a vér-glióma gát átjárhatóságát két festékanyag, a nátrium fluoreszcein (SF, 376 Da, 2 %) és az Evans késsel jelölt albumin (EBA, 67 kDa, 2 %), agyba való bejutásával vizsgáltuk tezmilifen kezeléssel (5 mg/kg, iv., n=6) vagy anélkül (fiziológiás sóoldat, n=6). A permeabilitási kísérlet után szövetmintákat gyűjtöttünk az agy alábbi részeiből: kisagy, középagy, jobb és bal agykéreg, és glióma szövet. A jelzőanyagok mennyiségét a felülúszóból spektrofotométerrel (Photon Technology International Inc., USA) határoztuk meg.

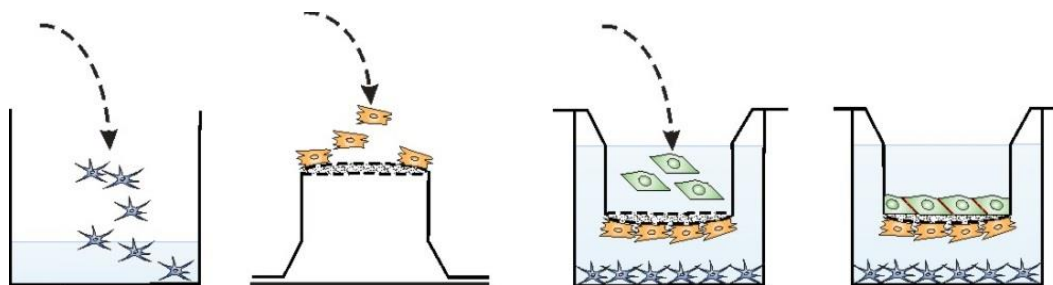
2.4. Sejttenyésztés

2.4.1. RG2 glioblasztóma sejtvonal

Az RG2 glioblasztóma sejtvonalat az ATCC cégtől (American Tissue Culture Collection, USA) vásároltuk. Az RG2 sejteket tápfolyadékban (Dulbecco's modified Eagle's Medium, DMEM) tartottuk, amelyet 10 % borjúsavóval és gentamicinnel (50 µg/ml) egészítettünk ki. Minden tenyésztési felületet patkány farok ínből kinyert kollagénnel vontunk be a sejtkirakást megelőzően, elősegítve a sejtek jobb letapadását és növekedését.

2.4.2. A vér-agy gát *in vitro* modellezése

A kísérleteinket primer patkány agyi endotél egysejtrétegeken, valamint kettő és három sejttípusból álló ko-kultúra modelleken végeztük, amelyekhez primer patkány agyi endotél-, glia- és pericita sejteket használtunk. A sejtek izolálásának és a modellek összeállításának lépéseit több közleményünkben is leírtuk (Nakagawa és mtsai, 2009; Veszélka és mtsai, 2013; Hülper és mtsai, 2013; Jaehne és mtsai, 2014; Walter és mtsai, 2015; 2. ábra).



2. ábra: A vér-agy gát ko-kultúra modell összeállításának lépései: 1. gliasejtek tenyésztése, 2 hét növesztés; 2. periciták passzálása a sejttenyésztő membrán alsó oldalára; 3. agyi endotélsejtek szélesztése a membrán felső oldalára; 4. a kész ko-kultúra modell.

A primer agyi endotélsejt tenyésztés első négy napján 4 µg/ml puromicint adtunk a tápfolyadékhoz, hogy növeljük a tenyészet tisztaságát. Az endotélsejtek tenyésztő médiuma a

következő összetevőkből állt: DMEM/F12, borjúplazmából készített savó (15 %, First Link Ltd., Egyesült Királyság), bázikus fibroblaszt növekedési faktor (1 ng/ml, Roche), heparin (100 µg/ml), inzulin (5 µg/ml), transferrin (5 µg/ml), nátrium-szelenit (5 ng/ml) és gentamicin (50 µg/ml). Az agyi endotélsejtek barrier funkciójának növeléséhez 500 nM hidrokortizon (tezmilifen kísérletek) vagy ciklikus AMP kezelést alkalmaztunk (250 µM CPT-cAMP + 17,5 µM foszfodiészteráz gátló RO 201724, Roche; alkilglicerol kísérletek) 24 vagy 48 órával a kísérlet kezdete előtt.

2.5. Tenyészetek kezelése

A kísérleteink során a rövidláncú alkilglicerolokat 15 – 60 mM koncentrációban, 5 perces kezelési idővel használtuk. Az alkilglicerol kezelést követően akut hatást, valamint a rezisztenciamérés, a permeabilitási vizsgálatok és az immunhisztokémia esetén 10 – 30 perc hosszú visszaállási időszakot is teszteltünk a tápfolyadék visszaadásával. A szoros kapcsolatok megnyitására referencia kezelésként hiperozmotikus mannitolt (1,4 M) alkalmaztunk a klinikai értékeknek megfelelően. A tezmilifen hatását az 1 – 200 µM koncentráció tartományban és az 1, 16 és 24 órás kezelési időpontokban vizsgáltuk agyi endotélsejteken. Mindkét kísérletsorozatban a kontroll csoportba a nem kezelt, azonban minden más körülményben azonosan tenyésztett és vizsgált sejtek tartoztak. A kezelések sejtenyésztió médiumban történtek. Az alkilglicerollal végzett kísérletek esetén az életképességi vizsgálatokban izotóniás sóoldatot használtunk a korábbi patkány kísérletekhez hasonlóan.

2.6. Életképességi vizsgálatok

Az agyi endotélsejtek életképességében bekövetkezett változásokat alkilglicerol és tezmilifen kezelés hatására számos teszttel vizsgáltuk. Festékredukción alapuló MTT és WST tesztekben az élő, metabolikusan aktív sejtek a tetrazólium festékeket kék színű formazán kristályokká alakítják át, tehát a toxikus, illetve károsító hatás mértékével arányosan csökken a festék redukciója. Az apoptotikus sejthalál mértékének meghatározásához alkilglicerol kezelést követően egy enzim kötött immunoszorbens (ELISA) kitet használtunk, a gyártó által megadott kísérleti protokollt követve (Roche). Az RTCA-SP rendszer (ACEA Biosciences, USA) sejtenyészeti biológiai állapotának nyomon követésére alkalmas jelzőanyag használata nélkül. A műszer a sejtek növekedéséről, életképességéről, letapadásának mértékéről valós időben ad információt egy speciális, 96-lyukú, az alján arany mikro-elektrodákat tartalmazó lemez (E-plate) segítségével. A rendszer nagy előnye, hogy a sejtek

monitorozása folyamatos, a sejtek és az érzékelő elektródák között az impedanciát tenyészetes körülmények között, zavarásmentesen mérhetjük. A tezmilifen esetében kettős fluoreszcens sejtmagi jelöléssel is ellenőriztük a toxicitást. A metabolikus aktivitásban bekövetkezett további változások vizsgálatára meghatároztuk az endotélsejtekben az adenosin trifoszfát termelődését. Méréseinkhez a CellTiter-Glo lumineszcencia kitet használtuk (Promega, Madison, WI, USA) a gyártó leírásának megfelelően.

2.7. Az agyi endotélsejtek gátfunkciójának vizsgálata

2.7.1. Transzendoteliális elektromos ellenállás mérése

Az agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok a paracelluláris út szabad átjárhatóságát korlátozzák. A sejtrétegeken keresztül mérhető elektromos ellenállás a TJ szorosságát tükrözi. Az ellenállást EVOM rezisztencia-mérővel (WPI, USA) és STX-2 elektródákkal mértük a kettős és hármas ko-kultúra modelleken. A TEER értékekből ($\Omega \times \text{cm}^2$) levontuk a sejtmentes tenyésztő betéteken mért értékek átlagát ($120 \Omega \times \text{cm}^2$).

2.7.2. Permeabilitás vizsgálat

Az agyi endotélsejt rétegek permeabilitásának meghatározására két olyan jelzőanyagot használtunk, amelyekre a vér-agy gát áteresztőképessége élettani körülmények között alacsony. A paracelluláris útvonalon való átjutás mértékének meghatározására fluoreszcint használtunk, míg az endotélsejteken keresztüli átjutást albuminnal mértük az *in vivo* kísérletekhez hasonlóan. A jelzőanyagok koncentrációját az alsó kompartmentből, a tenyésztőedény lyukaiban maradt oldatokból határoztuk meg többlyukú lemez leolvasóval. A kapott eredményeket az endotélsejtréteg permeabilitási együtthatója (P_e) formátumban fejeztük ki, amely egy felszíntől és koncentrációktól független érték.

2.8. Immunhisztokémia

A kísérletek során az agyi endotélsejtek integráns membrán TJ fehérjéi közül a kladin-5 fehérjét, a citoplazmatikus linker molekulák közül pedig a β -katenint és a zonula occludens-1 (ZO-1) fehérjét mutattuk ki immunfestéssel alkilglicerol, valamint tezmilifen kezelés után. Primer antitestként anti-kladin-5 (egér monoklonális, Zymed/Invitrogen, Life Technologies), anti-ZO-1 és anti- β -katenin (nyúl poliklonális, Invitrogen) ellenanyagokat használtunk. Másodlagos ellenanyagként Alexa Fluor-488-jelölt anti-egér (Life Technologies) és Cy3-jelölt anti-nyúl ellenanyagot alkalmaztunk bisz-benzimid magfestéssel kombinálva. A mintákat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Nikon Eclipse TE 2000).

2.9. Fagyasztva tört minták elektronmikroszkópos vizsgálata

A szoros kapcsolatok finomszerkezetének vizsgálatához a mintákon fagyasztva töréses kísérletet végeztünk a korábban leírt módszer szerint (Wolburg és mtsai, 1994). Akut PG és HG kezelés, valamint 30 perces helyreállítás után a sejteket elektronmikroszkópiára fixáltuk. Fagyasztva törést követően a TJ-k gyöngysorszerűen láthatók fagyasztva töréses mintákon, és vagy a P-oldalon (plazmaállomány felőli membrán lemez), vagy az E-oldalon (extracelluláris térhez fagyott lemez) helyezkednek el. A P- és E-oldalon megjelenő TJ fonatok aránya a gát funkció működésének fontos indikátora.

2.10. Efflux pumpa vizsgálatok: P-glikoprotein (Pgp), emlőrák rezisztencia fehérje (Bcrp) és multidrog rezisztencia asszociált protein-1 (Mrp-1) aktivitásának mérése

Kísérleteinkben a két legfontosabb vér-agy gát efflux pumpa, a Pgp és a Bcrp aktivitását határoztuk meg a rodamin 123 fluoreszcens ligand sejtekben való felhalmozódásával. A glutation-S-bimán az Mrp-1 szubsztrátja és segítségével vizsgálható a transzporter aktivitása. Sejtekben a bimánhoz enzimek glutationt kapcsolnak, ami így fluoreszcens vegyületté alakul.

2.11. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (PCR)

A génexpresszió vizsgálatához az agyi endotélsejteket 10 cm-es csészékben tenyésztettük. A konfluens endotélsejt rétegeket 100 μ M tezmilifennel 1 órán keresztül kezeltük, a sejteket sejtkaparókkal összegyűjtöttük ribonukleinsav (RNS) izolálásra. A génexpressziós vizsgálatot korábban leírt módszerünk szerint hajtottuk végre (Tóth és mtsai, 2014). A vér-agy gát szempontjából fontos gének expressziós szintjének analízisét kvantitatív PCR-rel (qPCR) végeztük, TaqMan Low Density Array 384-lyukú mikrofluidikai rendszerben, amely alkalmas az általunk meghatározni kívánt gének analízisére (Applied Biosystems). Minden gén kifejeződését a 18 S rRNS-hez, mint belső kontrollhoz normalizáltuk, mivel ez a gén minden eukarióta sejtben nagymértékben expresszálódik. A vizsgált gének expressziós értékének meghatározása a gének $2^{-\Delta Ct}$ formula segítségével kiszámított normalizált expressziójának a legkisebb, a módszer által még detektálható expresszióhoz való viszonyításával történt.

2.12. Statisztikai kiértékelés

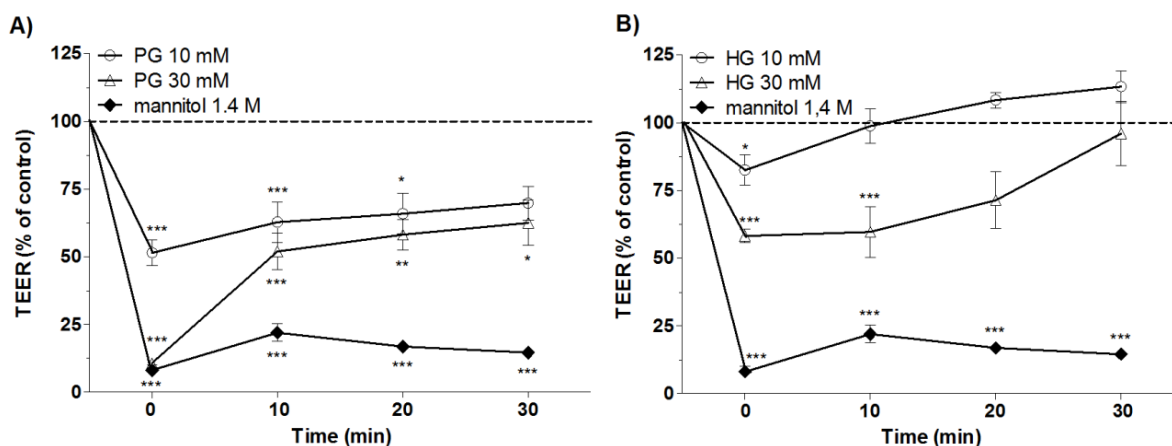
A statisztikai kiértékelésekhez a GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA) programot használtuk. A kísérletekben kapott eredményeket átlag \pm S.E.M. (az átlag standard

hibája) formában adtuk meg, kivéve a tezmilifen *in vivo* adatsorát. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értékeket tekintettük. Minden *in vitro* kísérletet külön izolált primer tenyészetből legalább háromszor megismételtünk és az egyes kísérletekben alkalmazott párhuzamos minták száma legalább három volt. D'Agostino-Pearson normalitási tesztet követően egyutas variancia analíziseket, valamint ANOVA analíziseket végeztünk Dunnett, Bonferroni, Kruskal-Wallis és Dunn tesztekkel.

3. Eredmények

3.1. Alkilglicerolok hatása tenyésztett agyi endotélsejtekre

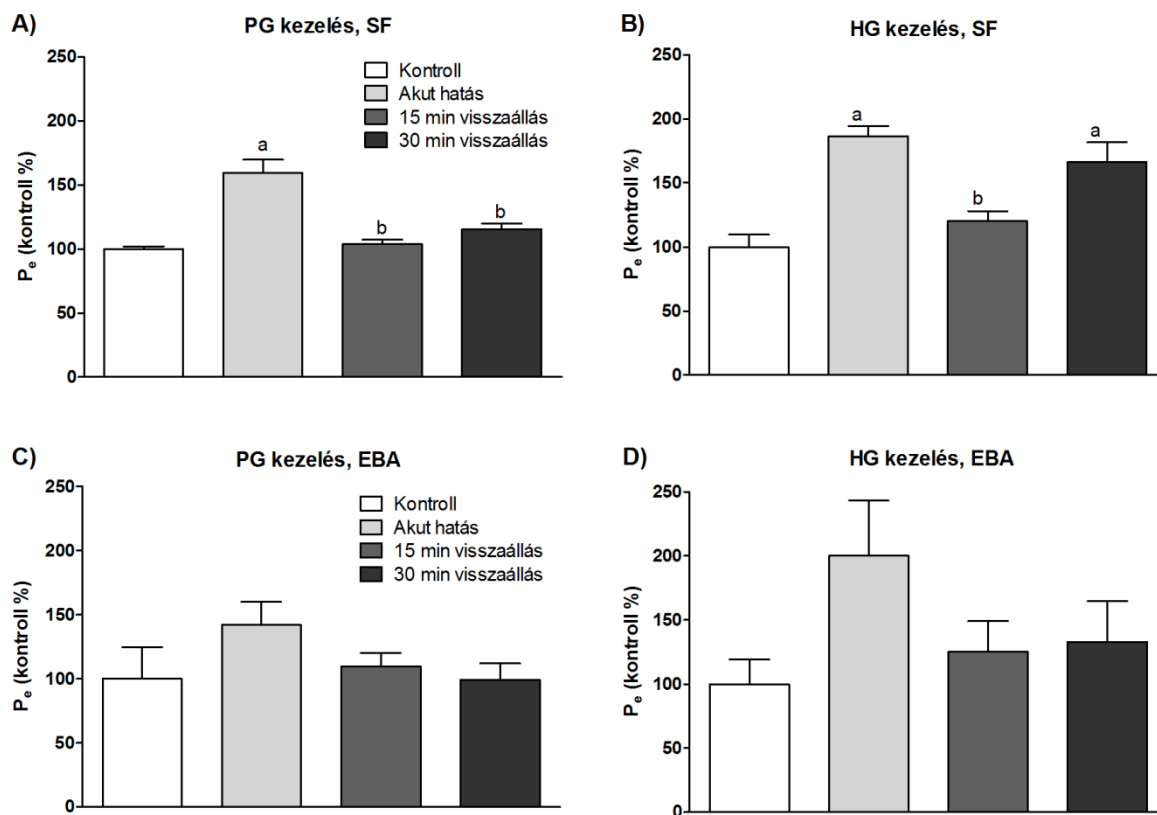
A nagy koncentrációjú alkilglicerol (60 mM) kezelés csökkentette az agyi endotélsejtek életképességét, ezért ezt a koncentrációt későbbi kísérletekben nem használtuk. Akut PG és HG kezelést követően szignifikáns rezisztencia csökkenést mértünk a kontrollhoz képest. PG esetén a réteg ellenállásának a helyreállása nem volt teljes, de az akut kezelés utáni TEER emelkedés a PG kezelés visszafordíthatóságát mutatja (3. A ábra). A HG hatása hasonló volt a PG-hez, rezisztenciaesést tapasztaltunk a kontrollhoz képest, és a réteg rezisztenciája teljes mértékben visszaállt a kontroll szintjére 30 perc után (3. B ábra). A mannitol (1,4 M) nagymértékű rezisztenciaesést okozott, a sejtrétegek ellenállása 30 perc alatt nem állt helyre, tehát hatása ilyen rövid idő alatt nem volt visszafordítható.



3. ábra. Transzendenteliális elektromos rezisztencia (TEER) mérés: alkilglicerolok hatása agyi endotélsejt rétegek ellenállására. A) PG: pentilglicerol, B) HG: hexildiglicerol. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ a kezeletlen kontrollhoz képest.

A rezisztencia adatok kiegészítésére és a barrier tulajdonságokban bekövetkezett változások további jellemzésére a fluoreszcein és az albumin jelzőanyagok átjutását vizsgáltuk a vér-agy gát ko-kultúra modellen (4. ábra). Rövid idejű PG és HG kezelést

(5 perc, 30 mM) követően jelentősen megnövekedett a fluoreszcein átjutása a sejtrétegen, míg az albumin transzcitózis mértéke nem változott szignifikánsan.



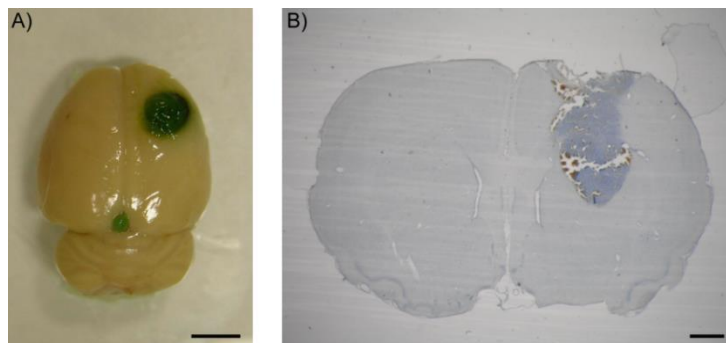
4. ábra. Permeabilitási vizsgálat: alkilglicerolok hatása agyi endotélsejtek nátrium fluoreszcein (SF) és Evans késsel jelölt albumin (EBA) permeabilitására. PG: pentilglicerol, HG: hexyldiglicerol. a, $p < 0,05$ a kezeletlen kontrollhoz képest; b, $p < 0,05$ az akut hatáshoz képest.

A visszaállási fázisban 15 perc után mindkét hatóanyag esetén a fluoreszcein átjutás a kontroll szintjére csökkent vissza (4. ábra). Ezek az eredmények alátámasztják a TEER mérési adatainkat és valószínűsítik, hogy az alkilglicerolok a paracelluláris út megnyitásával növelik a vér-agy gát átjárhatóságát. Az agyi endotélsejt rétegeken mért rezisztencia és a permeabilitási adatokat a szoros kapcsolatokban található klaudin-5, és az adherens junction asszociált β -katenin fehérjék immunhisztokémiai festése is alátámasztotta.

A fagyasztva törés vizsgálatokban megállapíthattuk, hogy a kontroll esetén megfigyelhető E/P-oldal arány nem változott meg sem PG, sem HG kezelés hatására és a visszaállási fázisban sem. Emellett a TJ fonatok gyöngyszerű lefutása sem módosult, így elmondható, hogy a szoros kapcsolatok finomszerkezetében és komplexitásában nem következett be változás alkilglicerol kezelés hatására.

3.2. Tezmilifen hatása a vér-glióma gátra és tenyésztett agyi endotélsejtekre

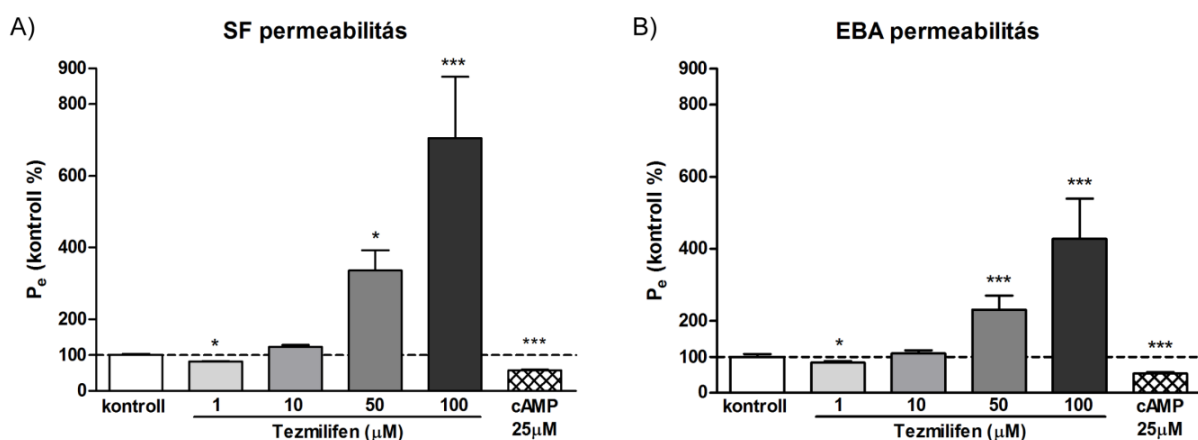
A tezmilifen kezelés sokkal nagyobb mértékben, szelektíven növelte a kis molekulájú jelzőanyag bejutását a glióma szövetbe, mint a gliómát körülvevő agyszövetbe patkányokban, RG2 glioblasztóma sejt implantációt követően (5. ábra).



5. ábra. Vér-agy/vér-glióma gát permeabilitási kísérlet patkányokban. A) A glióma a jobb agyféltekében látható. A lambda pont magasságában a tobozmirigy található. Mércé: 5 mm. B) A glióma méretének és anatómiai helyzetének bemutatása agyszeleten. Mércé: 1 mm.

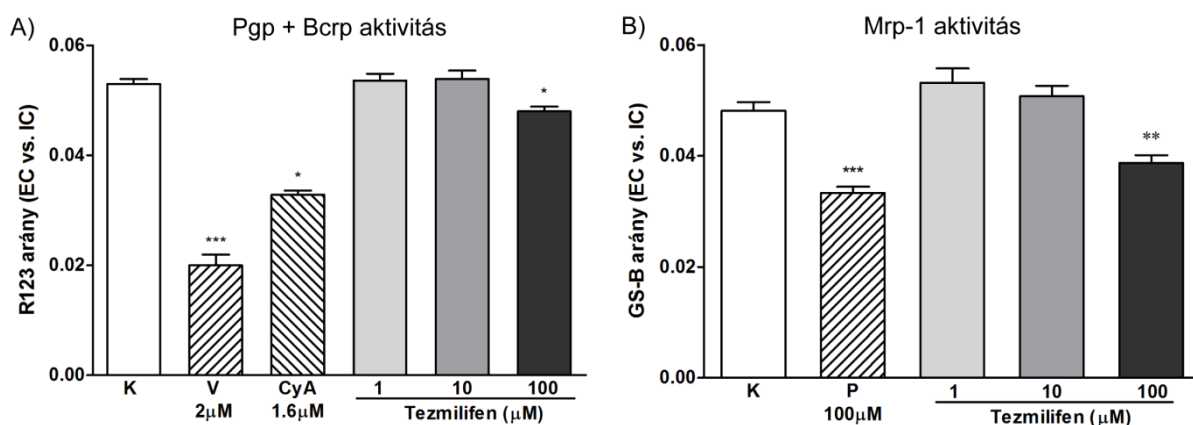
Tenyészetes vizsgálatokban a nagy koncentrációjú tezmilifen (200 μ M) kezelés csökkentette az agyi endotélsejtek életképességét, ezért ezt a koncentrációt nem használtuk.

A barrier integritási tesztekben a hármas ko-kultúra modellen a tezmilifen csökkentette agyi endotélsejtek ellenállását a 100 μ M kezelési koncentrációban. A tezmilifen (50 és 100 μ M) megnövelte mind a fluoreszcein, mind az albumin átjutását a sejtrétegeken, azonban az 1 μ M-os kezelés csökkentette a jelzőanyagok permeabilitását. Mindkét jelzőanyag agyi endotélsejt rétegen való átjutása csökkent cAMP (25 μ M) hatására (6. ábra). A junkcionális fehérjék immunfestése is igazolta, hogy az 50 és 100 μ M-os tezmilifen kezelés megváltoztatta a sejtek közötti kapcsolatok morfológiáját.



6. ábra. Permeabilitási tesztek a vér-agy gát hármas ko-kultúra modelljén. A) és B) tezmilifen hatása agyi endotélsejtek nátrium fluoreszcein (SF) és Evans késsel jelölt albumin (EBA) permeabilitására. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ a kezeletlen kontrollhoz képest.

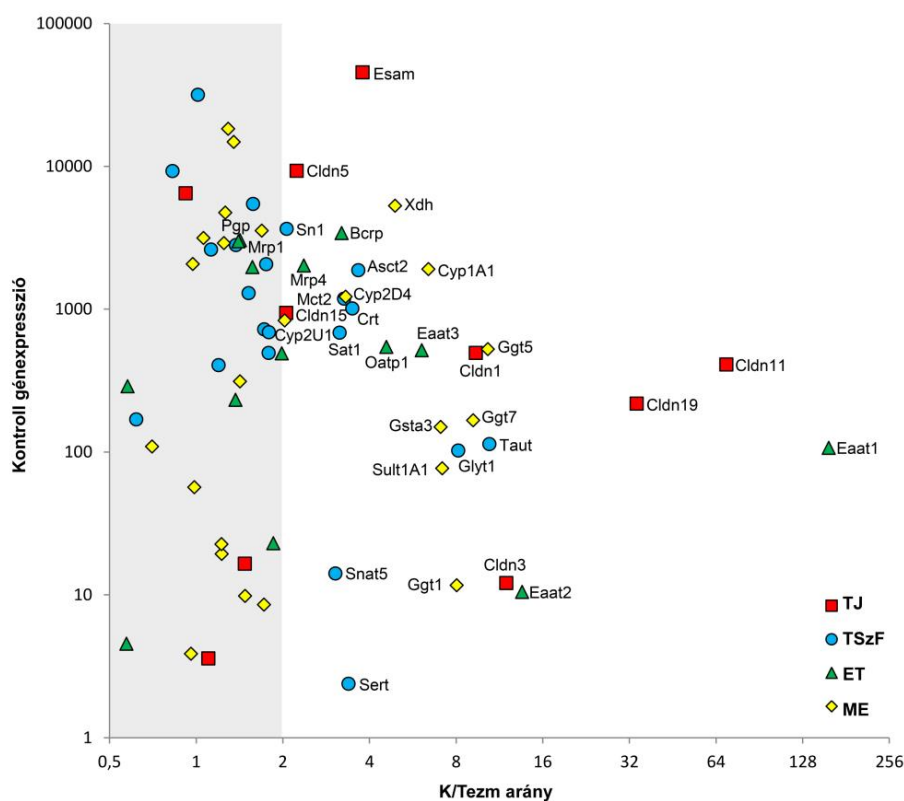
A tezmilifen kezelés hatását efflux pumpákra is megvizsgáltuk. A teszt során a jól ismert Pgp és Bcrp aktivitást gátló vegyületek, a ciklosporin A és a verapamil; valamint az Mrp-1 aktivitását gátló probenecid hatását is megmértük az agyi endotélsejteken. Az inhibitorok szignifikánsan csökkentették a fluoreszcens jelzőanyagok agyi endotélsejtekből való kiáramlását, amit a lecsökkent extracelluláris/intracelluláris hányados mutat (7. ábra). A tezmilifen kezelés (100 μ M) szignifikánsan csökkentette a ligand effluxot a gátlószerekhez hasonlóan. Alacsony tezmilifen kezelési koncentrációk nem voltak hatással a pumpaműködésre.



7. ábra. A tezmilifen hatása agyi endotélsejtek efflux pumpáinak aktivitására. A) A P-glikoprotein (Pgp) és az emlőrák rezisztencia fehérje (Bcrp) aktivitásának mérése rodamin 123 (R123) fluoreszcens liganddal. B) A multidrog rezisztencia asszociált fehérje-1 (Mrp-1) aktivitásának mérése glutation konjugált bimánnal (GS-B). K: kontroll; V: verapamil; CyA: ciklosporin A; P: probenecid; EC: extracelluláris; IC: intracelluláris koncentráció. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ a kezeletlen kontrollhoz képest.

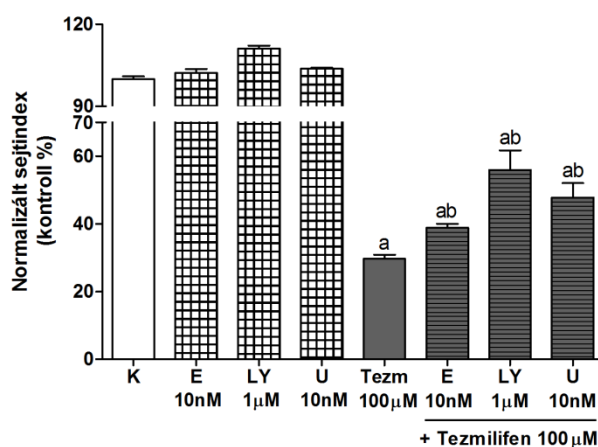
4.2.7. Tezmilifen kezelés hatása az agyi endotélsejtek génexpressziójára

A tezmilifen (100 μ M kezelés, 1 óra) csökkentette számos, a vér-agy gát szempontjából fontos gén expresszióját agyi endotélsejtekben a kontroll, kezelést nem kapott csoporthoz képest (8. ábra). Mind a négy fehérjecsalcid több tagjánál is downregulációt figyeltünk meg, az alábbiakban a jelentősebb változásokat emeljük ki. A junkciós fehérjék közül az Esam és klaudin-1, -3, -5, -11, -19 mRNS szintje, az efflux pumpák közül főképpen a Bcrp, Mrp-4, szerves anion transzporter polipeptid-1 (Oatp1) és serkentő aminosav transzporter-2, -3 (Eaat-2,-3) szintje csökkent. Az SLC fehérjék közül az aminosavakat (Sat-1, Snat-5), a kreatint (Crt), az aszkorbinsavat (Asct2), a glicint (Glyt1), a taurint (Taut), a pajzsmirigy hormonokat (Mct8) szállító karrierek downregulálódtak. A vér-agy gát metabolikus enzimek közül a szulfotranszferáz (Sult1A1), a Cyp2D4 és a γ -glutamil transzferázok (Ggt-1, -5, -7) esetében mértünk mRNS csökkenést (8. ábra).



8. ábra: Tezmilifen hatása az agyi endotélsejtek génexpressziójára. TJ: szoros kapcsolatok fehérjei; TSzF: Tápanyagszállító fehérjék, SLC transzporterek; ET: efflux transzporterek; ME: metabolikus enzimek; Tezm: tezmilifen; K: kontroll csoport. Az ábrán a kétszeresnél nagyobb mértékű mRNS expresszió csökkenést az X-tengelyen a 2 feletti értékek jelölik.

A tezmilifen hatásmechanizmusának felderítésére megvizsgáltuk az agyi endotélsejtek működésének szabályozásában fontos MAPK/ERK és PI3K/Akt szignalizációs útvonalak gátlószereit (U0126 és LY294002), valamint a β -ösztradiolt, az endotélsejtek ösztrogén receptorainak ligandját (9.ábra).



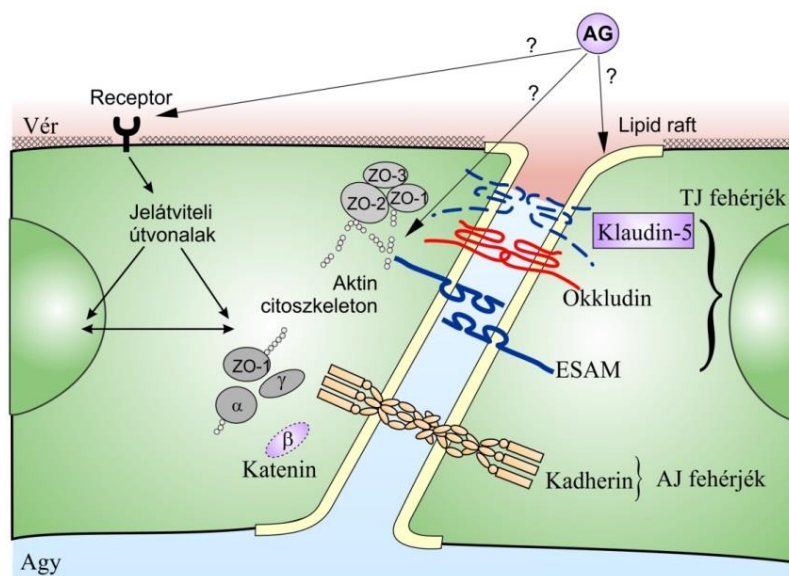
9. ábra: Tezmilifen hatása agyi endotélsejtek impedanciájára jelátviteli út inhibitorokkal (U0126 és LY294002) és β -ösztradiollal (β -estr) kombinációban. Tezm: tezmilifen. a, $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz képest; b, $p < 0,05$ a tezmilifenhez képest.

Ennek a három anyagnak a hatását önállóan és 100 μ M tezmilifen kezeléssel kombinációban is teszteltük (9. ábra). Rövid idejű, 1 óra kezelést követően mind a gátlószerek, mind a β -ösztadiol részlegesen kivédte a tezmilifen kezelés okozta impedancia csökkenést agyi endotélsejtekben.

Összefoglalás

Fontos és aktuális kutatási terület olyan új molekulák, módszerek és eljárások kifejlesztése, amelyekkel hatékonyabbá tehető a központi idegrendszeri gyógyszerbejuttatás a rosszindulatú agydaganatok kezelésére. Mivel a vér-agy gát kulcsszerepet játszik a vér és az agy közötti anyagtranszportban, vizsgálataink során két új, a vér-agy gátat megnyitó vegyület agyi endotélsejtekre kifejtett hatását tanulmányoztuk.

Kísérleteinkkel először mutattuk ki, hogy tenyésztett agyi endotélsejtek rövidláncú alkilglicerolokkal történt akut kezelése reverzibilisen növeli a vér-agy gát permeabilitását a paracelluláris útvonalon keresztül, hosszabb távú károsító hatás nélkül (10. ábra).

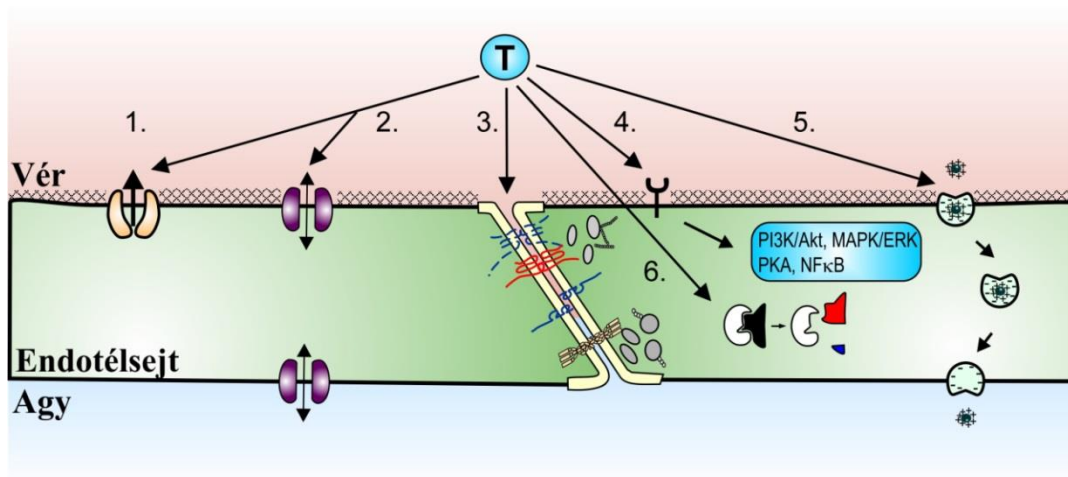


10. ábra: Az alkilglicerolok lehetséges hatásai agyi endotélsejteken. A paracelluláris transzportút megnyitásának potenciális mechanizmusai: receptorokon keresztüli hatás, a sejtek citoskeletális hálózatainak átrendezése a sejthalak megváltoztatásával, a lipid raftok módosítása, a membránfluiditás növelése.

A sejtek közötti kapcsolatok megnyílása nem járt együtt a sejtkapcsoló struktúrák finomszerkezeti átrendeződésével. A tenyészeteken kapott eredményeink azt mutatják, hogy az alkilglicerolok által létrehozott megnyílást követően az agyi endotél egysejtrétegek működése helyreáll, a vér-agy gát morfológiája és funkciói nem sérülnek. Adataink

mindenben alátámasztják a korábbi állatkísérletes eredményeket. Az alkilglicerolok hatásmechanizmusának teljes feltárásához a lipidomika irányába mutató további kísérleteket tervezünk.

Kísérleteinkben elsőként tártuk fel, hogy a kemoterápiás adjuváns tezmilifen sokkal jobban növelte a kis molekulatömegű jelzőanyag glióma szövetbe való bejutását az agyszövethez képest patkányokban. A tezmilifen számos olyan jelátviteli úton keresztül fejtheti ki a hatását agyi endotélsejteken, amelyek a vér-agy gát permeabilitását befolyásolják. Mivel emellett a tezmilifen az agyi endotélsejtek efflux pumpáinak az aktivitását is csökkentette, potenciálisan hatékony lehet kemoterapeutikumok agytumorkba való bejuttatásában (11. ábra).



11. ábra: A tezmilifen hatásai agyi endotélsejteken: 1. az efflux pumpák aktivitásának gátlása; 2. a tápanyagok transzportjának módosítása; 3. a paracelluláris transzportút megnyitása, a szoros kapcsolatot alkotó fehérjék génexpressziójának csökkentése; 4. a jelátviteli utak aktiválása; 5. az albumin transzport növelése; 6. a metabolikus enzimek aktivitásának csökkentése.

Az alkilglicerolokkal és a tezmilifennel kapott eredményeink felvetik annak lehetőségét, hogy ez a két vegyület a vér-agy gát megnyitásán keresztül alkalmas lehet gyógyszerbevitel fokozására agytumork kezelésében.

Tudományos mutatók:

MTMT azonosító: 10032624

Kumulatív hatástényező (IF): 39.242;

Összes hivatkozások száma: 97

Hirsch index: 4

Konferencia előadások száma (első+társsz.): 31

Konferencia posztterek száma (első+társsz.): 80

A tézis tárgyához tartozó tudományos közlemények

- I. Hülper P, Veszelka S, **Walter FR**, Wolburg H, Fallier-Becker P, Piontek J, Blasig IE, Lakomek M, Kugler W, Deli MA. Acute effects of short-chain alkylglycerols on blood-brain barrier properties of cultured brain endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*, 169: 1561-73 (2013) IF: 4,99
- II. **Walter FR**, Veszelka S, Pásztói M, Péterfi ZA, Tóth A, Rákhely G, Cervenak L, Ábrahám CS, Deli MA. Tesmilifene modifies brain endothelial functions and opens the blood-brain/blood-glioma barrier. *Journal of Neurochemistry*, közlés alatt, (2015) IF: 4,281

A tézis tárgyához közvetlenül nem tartozó tudományos közlemények

- I. Hellinger E, Veszelka S, Tóth AE, **Walter F**, Kittel A, Bakk ML, Tihanyi K, Háda V, Nakagawa S, Duy TD, Niwa M, Deli MA, Vastag M. Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 82: 340-51 (2012) IF: 3,826
- II. Kiss L, **Walter FR**, Bocsik A, Veszelka S, Ozsvári B, Puskás LG, Szabó-Révész P, Deli MA. Kinetic analysis of the toxicity of pharmaceutical excipients Cremophor EL and RH40 on endothelial and epithelial cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 102: 1173-81 (2013) IF: 3,007
- III. Veszelka S, Tóth AE, **Walter FR**, Datki Z, Mózes E, Fülöp L, Bozsó Z, Hellinger E, Vastag M, Orsolits B, Környei Z, Penke B, Deli MA. Docosahexaenoic acid reduces amyloid- β induced toxicity in cells of the neurovascular unit. *Journal of Alzheimer's Disease*. 36: 487-501 (2013) IF: 3,612
- IV. Jähne EA, Eigenmann DE, Culot M, Cecchelli R, **Walter FR**, Deli MA, Tremmel R, Fricker G, Smiesko M, Hamburger M, Oufir M. Development and validation of a LC-MS/MS method for assessment of an anti-inflammatory indolinone derivative by *in vitro* blood-brain barrier models. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 98: 235-46 (2014) IF: 2,979
- V. Tóth AE, **Walter FR**, Bocsik A, Sántha P, Veszelka S, Nagy L, Puskás LG, Couraud PO, Takata F, Dohgu S, Kataoka Y, Deli MA. Edaravone protects against methylglyoxal-induced barrier damage in human brain endothelial cells. *PLoS One*. 9:e100152 (2014) IF: 3,234
- VI. Schilling-Tóth B, Sándor N, **Walter FR**, Bocsik A, Sáfrány G, Hegyesi H. Role of GDF15 in radiosensitivity of breast cancer cells. *Central European Journal of Biology*. 9: 982-992 (2014) IF: 0,710
- VII. Sándor N*, **Walter FR***, Bocsik A, Sántha P, Schilling-Tóth B, Léner V, Varga Z, Kahán Z, Deli MA, Sáfrány G, Hegyesi H. Low dose cranial irradiation-induced cerebrovascular damage is reversible in mice. *PLoS One*. 9:e112397 (2014) IF: 3,234
- VIII. Tóth AE, Tóth A, **Walter FR**, Kiss L, Veszelka S, Ozsvári B, Puskás LG, Heimesaat MM, Dohgu S, Kataoka Y, Rákhely G, Deli MA. Compounds Blocking Methylglyoxal-induced Protein Modification and Brain Endothelial Injury. *Archives of Medical Research*. 45(8):753-64 (2014) IF: 2,645
- IX. Campos-Bedolla P, **Walter FR**, Veszelka S, Deli MA. Role of the Blood-Brain Barrier in the Nutrition of the Central Nervous System. *Archives of Medical Research*. 45:610-38 (2014) IF: 2,645
- X. Lénárt N*, **Walter FR***, Bocsik A, Sántha P, Tóth ME, Harazin A, Tóth AE, Vizler C, Török Z, Pilbat AM, Vigh L, Puskás LG, Sántha M, Deli MA. Cultured cells of the blood-brain barrier from apolipoprotein B-100 transgenic mice: effects of oxidized low-density lipoprotein treatment. *Fluids and Barriers of the CNS*. 12:17 (2015) IF: 0
- XI. Veszelka S, Bocsik A, **Walter FR**, Hantosi D, Deli MA. Blood-brain- barrier co-culture models to study nanoparticle penetration: focus on co-culture systems. *Acta Biologica Szegediensis*, közlés alatt (2015) IF: 0
- XII. **Walter FR***, Valkai S*, Kincses A, Petneházi A, Czeller T, Veszelka S, Ormos P, Deli MA, Dér A. A versatile lab-on-a-chip tool for modeling biological barriers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, közlés alatt (2015) IF: 4,097

*, a szerzők egyforma mértékben járultak hozzá a kéziratához